昆虫学报 Acta Entomologica Sinica, November 2012, 55(11): 1306 - 1314 ISSN 0454-6296

萧氏松茎象线粒体基因组全序列测定与分析

李国宏[1]，尚　娜[2]，魏建荣[3,*]
(1. 中国林业科学研究院森林生态环境与保护研究所，国家林业局森林保护学重点实验室，北京 100091；
2. 河北大学图书馆，河北保定 071002；3. 河北大学生命科学学院，河北保定 071002)

摘要：象甲是鞘翅目中物种最丰富的类群，目前关于其线粒体基因组全序列的研究还未见报道。本研究利用长距PCR和引物步移法对萧氏松茎象 *Hylobitelus xiaoi* Zhang 线粒体基因组全序列进行了测定。结果显示：萧氏松茎象线粒体基因组序列全长 16 123 bp(GenBank 登录号为 JX847496)，共编码 37 个基因和 1 个非编码的控制区，基因次序与典型的六足动物线粒体基因排列一致，未发现基因重排现象。在基因组中两个值得注意的发现分别是：1) N 链上存在 1 个额外的 *trnV*-like 序列，反密码子为 GAC，长度为 69 bp，其中 65 bp 与 J 链上的 *trnD* 重叠；2) $trnS^{UCN}$和 *nad*1 之间存在 1 个长度为 232 bp 的基因间隔区。全部 13 个蛋白质编码基因的起始密码子均为 ATN，9 个蛋白质编码基因的终止密码子为 TAA，其余 4 个蛋白质编码基因中，*nad*1 和 *cox*2 的终止密码子为 TAG，*nad*4 和 *nad*5 则以不完整的终止密码子 T 作为终止信号。除 $trnS^{AGN}$外，其余的 tRNAs 均可形成典型的三叶草结构。而 $trnS^{AGN}$的反密码子由 TCT 替代 GCT，反密码子臂延长形成 9 bp(中间含 1 个碱基突起)，TΨC 臂由正常的 5 bp 变为 6 bp，DHU 臂缩短仅 1 bp，各个臂之间没有连接碱基。线粒体控制区中包括 10 处长度不少于 5 bp 的 poly-T(最长 poly-T 长度为 14 bp)和 2 处微卫星样重复序列 $(TA)_6$ 和$(TA)_9$。本研究结果为探讨象甲总科在鞘翅目中的系统学地位及其与其他总科间的系统发生关系等问题提供了重要的分子生物学数据。

关键词：鞘翅目；象甲总科；萧氏松茎象；线粒体基因组；长距 PCR；引物步移法
中图分类号：Q969　　**文献标识码**：A　　**文章编号**：0454-6296(2012)11-1306-09

Sequencing and analysis of the complete mitochondrial genome of *Hylobitelus xiaoi* (Coleptera: Curculionidae)

LI Guo-Hong[1], SHANG Na[2], WEI Jian-Rong[3,*] (1. Key Laboratory of Forest Protection of State Forestry Administration, Research Institute of Forest Ecology, Environment and Protection, Chinese Academy of Forestry, Beijing 100091, China; 2. Library, Hebei University, Baoding, Hebei 071002, China; 3. College of Life Sciences, Hebei University, Baoding, Hebei 071002, China)

Abstract: The Curculionoidea is one of the richest groups in Coleptera, but the research about its complete mitochondrial genome has not been reported. In this study, the complete mitochondrial genome (mitogenome) of *Hylobitelus xiaoi* Zhang was determined using long PCR (L-PCR) and primer walking technology. The entire mitochondrial DNA (mtDNA) molecule is 16 123 bp in length and its overall nucleotide composition is heavily biased towards As and Ts, which account for 75.66% of the whole genome. The *H. xiaoi* genes are arranged in the same order and orientation as the other hexapod species, except for the occurrence of one 69 bp *trnV*-like region with anticodon GAC that overlaps 65 bp with the reversely encoded *trnD* and the presence of 232 bp long intergenic spacer between $trnS^{UCN}$ and *nad*1. All protein-coding genes (PCGs) start with a typical ATN codon. Nine of 13 PCGs have a complete termination codon TAA, while the remaining *nad*1 and *cox*2 are terminated with TAG, *nad*4 and *nad*5 with the incomplete T. All tRNAs show the typical clover-leaf structure, except for $trnS^{AGN}$. It habors anticodon TCT instead of GCT, a lengthened 9 bp anticodon stem with a bulged nuleotide in the middle, an unusual 6 bp TΨC-stem, and a mini 1 bp DHU-stem and no connector nucleotides. The control region (CR) contains one 14 bp Poly-T sequence (ten Poly-T sequences more than 5 bp and two microsatellite-like repeating sequences $(TA)_6$ and $(TA)_9$. The results of this study will provide some important molecular data for discovering phylogenetic relationships among the superfamilies of Coleptera.

基金项目：中央级公益性科研院所基本科研业务费专项资金(CAFRIFEEP201007)
作者简介：李国宏，男，硕士，助理研究员，主要从事林木蛀干害虫研究，E-mail：lmz9827@yahoo.com.cn
* 通讯作者 Corresponding author，Tel.：0312-5077334；E-mail：weijr@hbu.edu.cn
收稿日期 Received：2012-09-24；接受日期 Accepted：2012-11-19

Key words: Coleoptera; Curculionoidea; *Hylobitelus xiaoi*; mitochondrial genome; long PCR (L-PCR); primer walking

线粒体基因组具有母系遗传，进化速率快，几乎不发生重组的特点，是研究不同动物类群起源、进化、系统发育及群体遗传学的理想分子标记。由于传统的线粒体基因组测定策略，要么涉及线粒体的分离，对研究对象的要求较为苛刻，需要较多的实验材料；要么以基因组总 DNA 作为模板直接进行 PCR 扩增，容易受到核内线粒体假基因(Numts)污染。由于六足动物普遍体型较小，对其线粒体基因组的研究一度显著落后于其他体型较大的动物类群。近年来，随着 L-PCR 技术的引入，利用 L-PCR 和嵌套 PCR 扩增策略测定了大量的六足动物线粒体基因组全序列(黄原等，2010)。

鞘翅目是六足总纲乃至动物界种类最多和分布最广的第一大目。迄今为止，全世界已记载 35 万余种，中国约 7 000 余种。截止 2012 年 9 月，GenBank 数据库中已有 25 种鞘翅目昆虫的线粒体基因组全序列被测定，是六足总纲中研究最为深入的 5 个目之一，其余的 4 个目分别为直翅目、半翅目、双翅目和鳞翅目。对于鞘翅目如此庞大的类群，其线粒体基因组全序列的研究远远不够，许多类群尚未涉及。

萧氏松茎象 *Hylobitelus xiaoi* Zhang，属鞘翅目(Coleptera)、多食亚目(Polyphaga)、象甲总科(Curculionoidea)、象虫科(Curculionidae)、松茎象属。1988 年在江西安福武功山林场首次发现(张润志，1997)。目前在我国江西、湖南、湖北、福建、广东、广西、贵州、云南等省区均有分布(罗永松和梅仁莲，2002；温小遂等，2004)。萧氏松茎象幼虫隐蔽性蛀食危害湿地松、火炬松、马尾松等树干基部及根部韧皮部，轻则影响树木生长、松脂流失，重则造成树木整株死亡。依据国际上有害生物危险性分析方法(Pest Risk Analysis, PRA)进行的分析表明，萧氏松茎象在我国属于接近高度危险的森林有害生物(宋玉双等，2001)。目前对萧氏松茎象的研究主要集中于它的分布与危害、生物学特性、防治技术措施及种群遗传等(唐艳龙等，2006；李国宏等，2012)。

目前，对于线粒体基因组的测定，多采取基于 GenBank 数据库中的相近类群序列设计 L-PCR 引物进行扩增的策略，在扩增时经常存在扩增条件难以把握、成功率低的情况。本文采用“通用引物扩增并测定保守基因片段——特异性 L-PCR 引物设计和扩增——基于 L-PCR 扩增结果的嵌套 PCR 扩增”策略，对萧氏松茎象线粒体基因组全序列进行了测定。测定萧氏松茎象线粒体基因组全序列对进一步研究其在系统发育中所处的地位以及在不同地理分布区域的种群遗传学具有重要意义。

1　材料与方法

1.1　实验材料

实验所用萧氏松茎象标本于 2012 年采集于江西省信丰县万隆林场，标本采集后立即置于无水酒精中浸泡保存，带回实验室后，置于 -20℃ 冰箱中保存备用。

1.2　总 DNA 的提取

取单头萧氏松茎象雄性成虫的胸部肌肉组织，采用血液/细胞/组织基因组 DNA 提取试剂盒(北京天根生化科技公司)，依照操作说明进行总 DNA 提取。

1.3　序列测定策略及方法

首先，根据 GenBank 数据库中的鞘翅目线粒体基因组序列，对 Folmer 等(1994)和 Simon 等(2006)报道的通用引物进行修订后，对线粒体 *cox*1 和 *cytb* 进行了测定，引物详细信息见表 1。

依据所获得的萧氏松茎象线粒体 *cox*1 和 *cytb* 片段，设计两对 L-PCR 引物(Liu *et al.*, 2006; Simon *et al.*, 2006)，引物详细信息见表 1。PCR 反应的总体积为 25 μL，包括 10 × buffer 2.5 μL，dNTPs mixture (各 2.5 mmol/L) 2.0 μL，上下游引物各 1 mmol/L，LA Taq polymerase 1.5 U，总 DNA 模板 3 μL。PCR 扩增在 Bio-Rad C1000™ 热循环仪上进行，程序为：94℃ 预变性 2 min，92℃ 变性 20 s，52℃ 退火 30 s，60℃ 延伸 3 min(前 20 个循环)，后 20 个循环，每循环延伸时间增加 20 s；然后 68℃ 后延伸 10 min。

最后，经琼脂糖凝胶电泳分离、纯化后的 L-PCR 扩增产物，用于后续 PCR 扩增的模板。后续 PCR 反应中的引物对，分别为基于已获得的萧氏松茎象线粒体 DNA 片段和参考 GenBank 数据库中的部分鞘翅目线粒体基因组序列对 Folmer 等(1994)，Su 等(1996)，Simon 等(2006)所报道引物修订后形

表 1 萧氏松茎象线粒体基因组全序列 PCR 扩增引物

Table 1 List of PCR primers for the *Hylobitelus xiaoi* mtDNA complete genome

引物名称 Primer name	引物序列(5′-3′) Primer sequence	引物用途 Use of primers	退火温度(℃) Annealing temperature	模板 Template
C1-J1490[a]	GGTCAACAAATCATAAAGATATTGG	*cox*1	49	
C1-N2198[a]	TAAACTTCAGGGTGACCAAAAAATCA			
C1-J1709[b]	AATCGGTGGATTCGGAAATTG	*cox*1	46	
C1-N2776[b]	GCATCWGGGTAATCAGARTA			
CB-J10933[b]	TATGTACTACCATGAGGACAAATATC	*cytb*	50	总 DNA
CB-N11367[b]	ATTACACCTCCTAATTTATTAGGAAT			Total DNA
LPA-J2123[c]	CATTTATTCTGATTTTTTGGTCATCCAGAAGTA	LPA	52	
LPA-N11240[c]	ATTGCGTAAGCAAATAAAAAATATCATTCTGG	*cox*1-*cytb*		
LPB-J11184[c]	GATAACTCCTATTCATATTCAACCAGAATGAT	LPB	52	
LPB-N2353[d]	TAAGCTCGTGTATCGACATCTATTCCAACAG	*cytb*-*cox*1		
LPA-J2123[d]	CATTTATTCTGATTTTTTGGTCATCCAGAAGTA	*cox*1	50	
CI-N2776[b]	GCATCWGGGTAATCAGARTA			
C1-J2756[d]	ACCTTTTTTCCTCAACATTT	*cox*1-*ocx*2	46	
C2-N3665[b]	CCGCAAATTTCTGAACATTG			
C2-J3399[d]	GCAATTGGTCACCAATGATACTG	*ocx*2-*atp*6	48	
A6-N4552[b]	ATGTCCWGCAATYATATTWGC			
A6-J4463[d]	TGCCCATCTAGTTCCTCAAGG	*atp*6-*cox*3	55(×5)/45(×30)	
C3-N5460[b]	TCAACAAAATGTCARTAYCA			
C3-J5319[d]	CAACTGGATTACATGGTCTTC	*cox*3-*trrnN*	46	
TN-N6160[d]	TCAATTTTATCATTAACAGTGA			
N3-J5747[b]	CCATTTGAATGTGGRTTTGAYCC	*nad*3-*nad*5	50	LPA 扩增产物
N5-N6500[d]	CATGGATGGATAGAATATTATGG			LPA product
ND5F[e]	CCTGTTTCTGCTTTAGTTCA	*nad*5	47	
ND5R[e]	GTCATACTCTAAATATAAGCTA			
N5-J7200[d]	ATTAGCCGCGATTCCTGCTAC	*nad*5-*nad*4	55(×5)/44(×30)	
N4-N8727[b]	AAATCTTTRATTGCTTATTCWTC			
N4-J8641[d]	CCTGATGAACATAATCCATG	*nad*4-*nad*4*L*	50	
N4L-N9742[d]	CAGTAGTTTTGTCGTTGTATAG			
N4L-J9648[b]	ACCTAAAGCTCCCTCACAWAC	*nad*4*L*-*cytb*	50	
CB-N11010[d]	TATCAACAGCAAAACCTCCTCA			
CB-J10621[d]	TTCTTCAATATGGAACTTTGG	*cytb*	47	
CB-N11247[d]	GCGTAAGCAAATAAAAAATATC			
CB-J11196[d]	TTATATTCAACCAGAATGAT	*cytb*-*nad*1	46	
N1-N12067[b]	AATCGWACTCCWTTTGATTTTGC			
N1-J11876[d]	CGTGGCAAAGTTCCTCGAACTCA	*nad*1-*rrnL*	52	
LR-N13000[d]	TTACCTTAGGGATAACAGCGTAA			
LR-J12888[b]	CCGGTTTGAACTCARATCATGTA	*rrnL*-*rrnS*	51	
SR-N14220[d]	ATATGTACACATCGCCCGTC			
LR-J13342[b]	CCTTTGCACRGTCAAAATACYGC	*rrnL*-*rrnS*	49	LPB 扩增产物
SR-N14756[b]	GACAAAATTCGTGCCAGCAGT			LPB product
SR-J14610[d]	ATAATAGGGTATC-TAATCCTAGT	*rrnS*-*trnM*	50	
TM-N200[b]	ACCTTTATAYTYGGGGTATGAACC			
TI-J34[b]	GCCTGATAAAAAGGRTTAYYTTGATA	*trnI*-*trnW*	50	
TW-N1284[d]	TTGACTTTGAAGGTCAATAGTTT			
N2-J590[b]	TCCAYTTYTGATTYCCTGAAG	*nad*2-*cox*1	48	
C1-N1738[d]	TTTAATCGTGGGAAAGCTATATC			

[a] Folmer 等(1994)设计 Designed by Folmer *et al*. (1994); [b] Simon 等(2006)设计 Designed by Simon *et al*. (2006); [c] 刘念等(2006)设计 Designed by Liu *et al*. (2006); [d] 基于 Simon 等(2006)引物修改而设计的特异性引物 Modified specific primers from Simon *et al*. (2006); [e] Su 等(1996)设计 Designed by Su *et al*. (1996).

成的特异引物和通用引物，引物详细信息见表 1。

PCR 反应的总体积为 50 μL，包括 10 × buffer 5.0 μL，dNTPs mixture（各 2.5 mmol/L）4.0 μL，上下游引物各 1 mmol/L，LA Taq polymerase 1.5 U，模板 2 μL。PCR 扩增在 Bio-Rad C1000™ 热循环仪上进行，程序为：94℃ 预变性 2 min，92℃ 变性 20 s，40 ~ 52℃ 退火 30 s，70℃ 延伸 1.5 min，然后 72℃ 后延伸 7 min。

PCR 扩增产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳检测，并用 DNA 片段凝胶回收试剂盒（三博远志公司）进行胶回收分离纯化。纯化后的 PCR 产物再连接到 pMD® 19-T 载体（TaKaRa 公司）上，经转化培养后挑取 3 个单克隆用 ABI 3730XL 全自动 DNA 测序仪进行双向测序（上海铂尚公司）。

1.4　序列组装与注释

萧氏松茎象线粒体基因组测序结果拼接与注释使用 Staden 序列分析软件包进行（Staden *et al.*, 2000）。首先，使用 tRNAscan-SE 进行 tRNA 编码基因注释（Lowe and Eddy, 1997；Schattner *et al.*, 2005），少数通过 tRNAscan-SE 无法识别的 tRNA 编码基因、蛋白质编码基因、rRNA 编码基因则采用 Staden 软件包中的 Spin 软件，通过与近缘种同源序列比对，结合 Blast 同源搜索确定。本研究使用 MEGA 4.0 对线粒体基因组各部分的碱基组成进行统计（Tamura *et al.*, 2007）。

2　结果与分析

2.1　萧氏松茎象线粒体基因组结构

萧氏松茎象线粒体基因组序列全长 16 123 bp，碱基 A + T 含量为 75.66%（GenBank 登录号为 JX847496）。萧氏松茎象线粒体基因组结构图如图 1 所示。基因间排列紧密，基因间重叠区域总长度 58 bp，分布于 15 个基因对之间，长度介于 1 ~ 10 bp 之间。线粒体控制区之外的基因间隔区总长度为 273 bp，分布于 8 个基因对之间，其中，最大的间隔区长度为 232 bp，位于 *trnS*^{UCN} 和 *nad*1 之间，其余 7 处长度介于 2 ~ 11 bp 之间（表 2）。通过对最大的间隔区进行序列分析，在 J 链上的开放读码框编码最长，编码 41 个氨基酸序列（基因组上的位置分别为 11 620 bp 和 11 745 bp），在 GenBank 数据库中进行 Blast 检索，没有发现明显的同源序列。

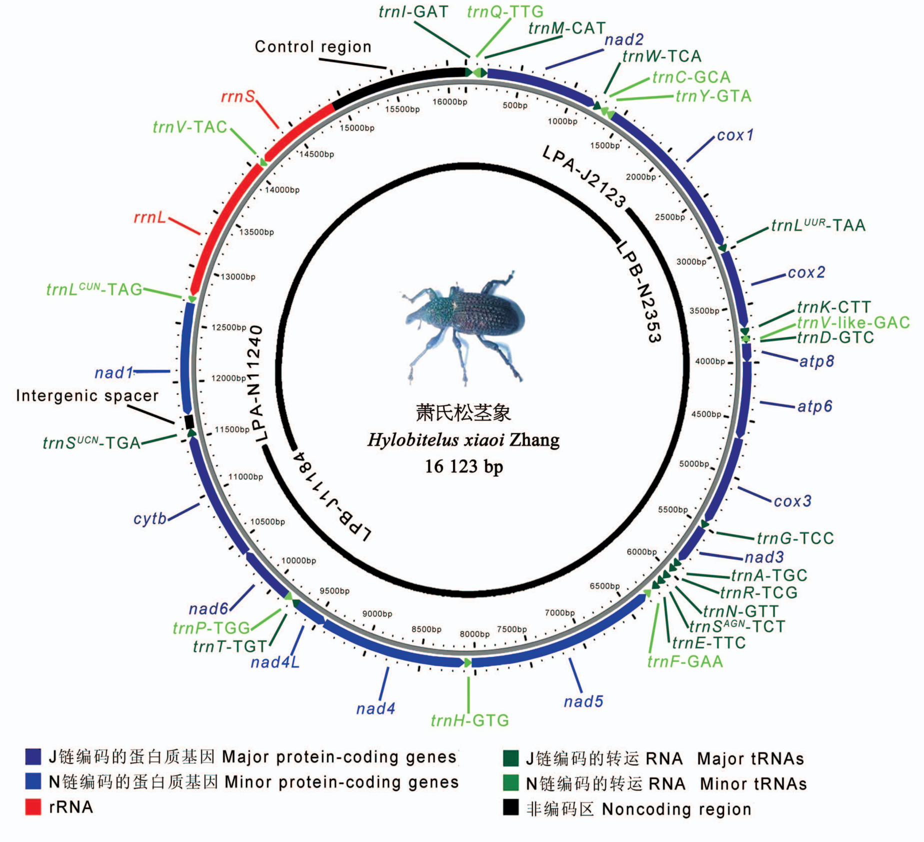


图 1　萧氏松茎象线粒体基因组结构图

Fig. 1　Circular map of the *Hylobitelus xiaoi* mitochondrial genome

表 2 萧氏松茎象线粒体基因组组成

Table 2 Organization of the *Hylobitelus xiaoi* mitochondrial genome

基因 Gene	位置 Site	长度 Size	编码链 Strand	间隔(+)/重叠(-) Noncoding/overlapping	起始密码子 Start codon	终止密码子 Stop codon	反密码子 Anticodon
trnI	1..65	65	J				GAT
trnQ	64..132	69	N	-2			TTG
trnM	132..200	69	J	-1			CAT
*nad*2	201..1 211	1 011	J		ATA	TAA	
trnW	1 214..1 277	64	J	2			TCA
trnC	1 277..1 344	68	N	-1			GCA
trnY	1 349..1 413	65	N	4			GTA
*cox*1	1 406..2 950	1 545	J	-8	ATT	TAA	
trnL^{UUR}	2 946..3 010	65	J	-5			TAA
*cox*2	3 011..3 706	696	J		ATT	TAG	
trnK	3 697..3 768	72	J	-10			CTT
trnV-like*	3 776..3 844	69	N				GAC
trnD	3 779..3 843	65	J	10			GTC
*atp*8	3 844..3 999	156	J		ATT	TAA	
*atp*6	3 993..4 667	675	J	-7	ATG	TAA	
*cox*3	4 667..5 455	789	J	-1	ATG	TAA	
trnG	5 467..5 530	64	J	11			TCC
*nad*3	5 531..5 884	354	J		ATT	TAA	
trnA	5 884..5 949	66	J	-1			TGC
trnR	5 950..6 015	66	J				TCG
trnN	6 015..6 078	64	J	-1			GTT
trnS^{AGN}	6 079..6 145	67	J				TCT
trnE	6 143..6 205	63	J	-3			TTC
trnF	6 204..6 268	65	N	-2			GAA
*nad*5	6 269..7 988	1 720	N		ATA	T	
trnH	7 986..8 050	65	N	-3			GTG
*nad*4	8 051..9 380	1 330	N		ATG	T	
*nad*4*L*	9 374..9 667	294	N	-7	ATG	TAA	
trnT	9672..9735	64	J	4			TGT
trnP	9 736..9 799	64	N				TGG
*nad*6	9 802..10 308	507	J	2	ATT	TAA	
cytb	10 309..11 448	1 140	J		ATG	TAA	
trnS^{UCN}	11 456..11 523	68	J	8			TGA
*nad*1	11 756..12 712	957	N	232	ATG	TAG	
trnL^{CUN}	12 707..12 771	65	N	-6			TAG
rrnL	12 772..14 068	1 297	N				
trnV	14 069..14 136	68	N				TAC
rrnS	14137..14 909	773	N				
控制区 Control region	14 910..16 123	1 214	-				

* *trnV*-like 未计入基因间隔/重叠区统计 *trnV*-like is excluded in noncoding/overlapping analysis. J：主编码链 Major strand；N：次编码链 Minor strand.

2.2　萧氏松茎象线粒体基因组蛋白质编码基因

萧氏松茎象线粒体基因组含有 13 个蛋白质基因(图 1，表 2)，总长度为 11 174 bp，A + T 含量为 74.12%，编码 3 713 个氨基酸(终止密码子除外)。共有 3 种典型的 ATN 起始密码子被使用，分别为 ATG(*cox*3，*atp*6，*nad*1，*nad*4，*nad*4*L* 和 *cytb*)、ATT(*cox*1，*cox*2，*atp*8，*nad*3 和 *nad*6)和 ATA(*nad*2 和 *nad*5)。终止密码子 TAA(*nad*2，*nad*3，*nad*4*L*，*nad*6，*cox*1，*cox*3，*atp*6，*atp*8 和 *cytb*)、TAG(*nad*1 和 *cox*2)和不完整的终止密码子 T(*nad*4 和 *nad*5)。

2.3　萧氏松茎象线粒体基因组 tRNA 基因和 rRNA 基因

萧氏松茎象线粒体基因组含有 22 个典型的 tRNA 基因和 1 个额外的 *trnV*-like 序列(图 1)。通过 tRNAscan-SE (Lowe and Eddy, 1997; Schattner *et al.*, 2005)共发现 19 个 tRNA 基因和 1 个 *trnV*-like。该 *trnV*-like 序列位于 N 链，反密码子为 GAC，长度为 69 bp，其中 65 bp 与位于 J 链的 *trnD* 重叠。剩余 3 个 tRNAs (*trnS*^{AGN}，*trnS*^{UCN}和 *trnV*)虽然 tRNAscan-SE 无法识别，但是由于其在基因组上保守的位置和序列相似性而被注释。除 *trnS*^{AGN}外，其余 tRNA 均可形成典型的三叶草二级结构(图 2)。*trnS*^{AGN}的反密码子由 TCT 替代 GCT，其二级结构符合 Steinberg 等(1997)中异常 tRNA 二级结构类型-9 *trnS*^{AGN}，反密码子臂延长形成 9 bp(中间含 1 个碱基突起)，TΨC 臂由正常的 5 bp 变为 6 bp，DHU 臂缩短仅 1 bp，各个臂之间没有连接碱基。tRNA 存在少量的碱基错配，分别是：17 处 G-U 分别位于 *trnI*，*trnM* 和 *trnQ* 的反密码子臂，*trnG*，*trnP*，*trnH*，*trnF*，*trnC* (2 处)和 *trnQ* 的 DHU 臂，*trnA*，*trnL*^{CUN}，*trnF*，*trnY* 和 *trnQ* 的氨基酸接受臂，*trnS*^{AGN}和 *trnL*^{CUN}的 TΨC 臂；4 处 U-U 分别位于 *trnQ*，*trnM* 和 *trnL*^{UUR}的氨基酸接受臂，*trnK* 的反密码子臂；2 处 A-A 分别位于 *trnV*-like 的 TΨC 臂和 *trnS*^{AGN}的反密码子臂；2 处 A-C 位于 *trnL*^{UUR}的反密码子臂。

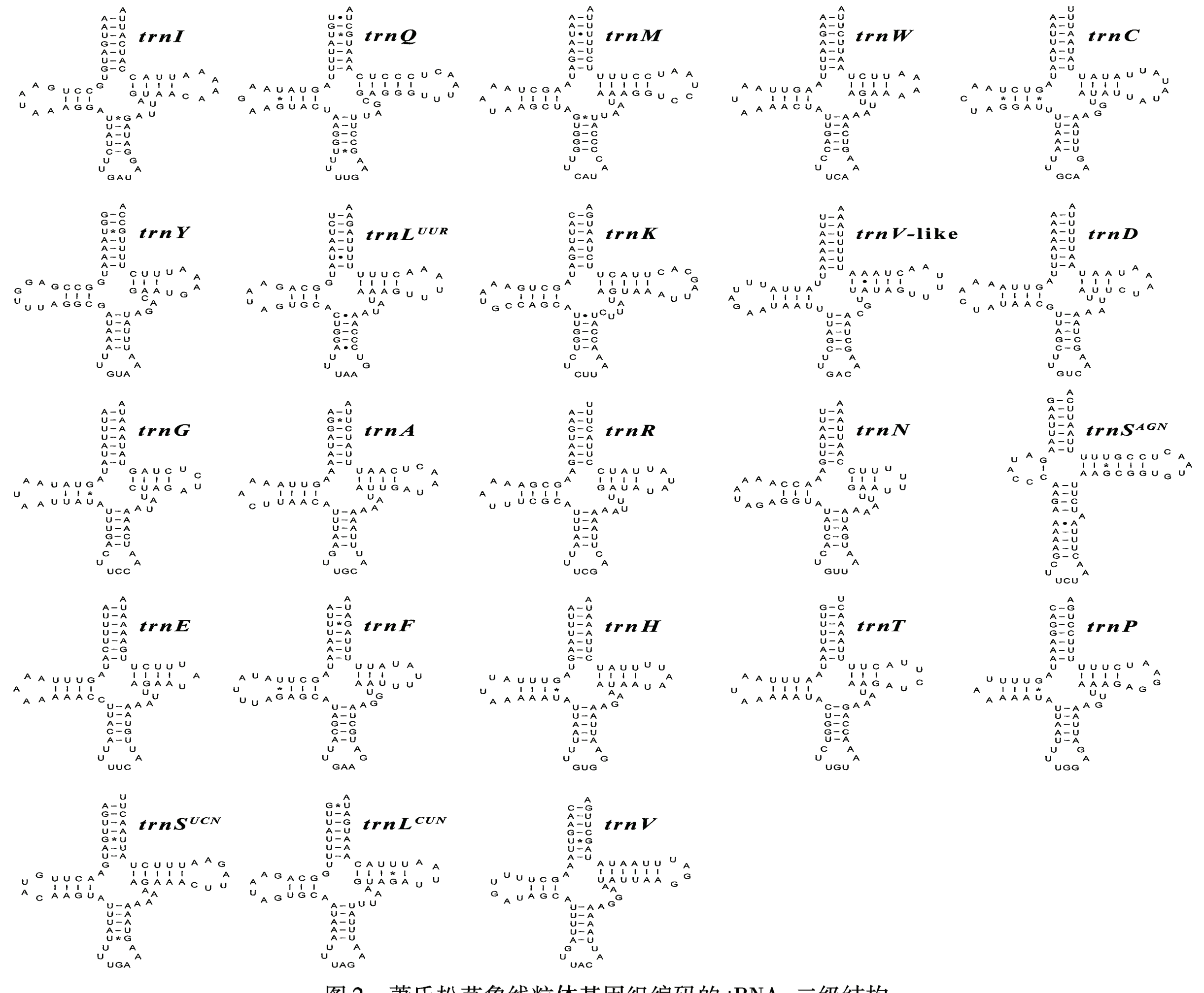


图 2　萧氏松茎象线粒体基因组编码的 tRNAs 二级结构

Fig. 2　Predicated clover-leaf secondary structures for tRNAs genes of *Hylobitelus xiaoi*

萧氏松茎象线粒体基因组中，*rrnL* 和 *rrnS* 位于 *trnL*^{CUN}和线粒体控制区之间，中间被 *trnV* 间隔开，长度分别为 1 297 bp 和 773 bp(图 1，表 2)，A + T 含量分别为 80.19% 和 78.01%。

2.4 萧氏松茎象线粒体基因组控制区

萧氏松茎象线粒体基因组控制区位于 *rrnS* 和 *trnI-trnQ-trnM* 基因簇之间，长度为 1 214 bp(图 1，表 2)，A + T 含量为 80.89%，是线粒体基因组中最主要的非编码区。控制区中包括 10 处长度不少于 5 bp 的 poly-T，其中，J 链最长的 poly-T 长度为 14 bp，在基因组的位置为 15 450 ~ 15 463 bp；N 链最长的 poly-T 长度为 8 bp，在基因组的位置为 14 936 ~ 14 943 bp。两处$(TA)_n$ 分别为$(TA)_6$ 和$(TA)_9$，在基因组中位置分别为 15 649 ~ 15 660 bp 和 15 700 ~ 15 717 bp。此外，在控制区中还包括一段长度为 32 bp 的重复序列，2 次重复中间间隔 29 bp，在基因组中位置分别为 15 209 ~ 15 240 bp 和 15 270 ~ 15 301 bp(图 3)。

```
GAACCTCCCGTAAACATGCAAACAATAAAAAAAAGAATGCTCCCCCCTAAAAAACAGCTA
                         Poly-T in N-strand
ACCACATTTAGCAATTTGACAATTTTTATACAAAGCTAAAATATTAACTCGAAACAAAAT
CCTTAAAATTTTACTAGTTAAATTTTCTTATATTATTAAACCCCAACTCGAAAAATTATA
ATATTTTTAACTTCCATATTAACATATTATATTAATGAATTCCCCTAAAATATTAATATA
AATTAACAGCGATCAAATTACAATAATTTAAATTTATATTCCCCAAAGCTTAAACCCCAA
CTCCGAAAAACAGCTATCCCCCTAGCTGTCTCATGTACGAAAATATACTAATTTAAATTT
          Repeat I
ACTCCGAAAAACAGCTATCCCCCTAGCTGTCTTATTATATAATTTTTTTAATAAATTTTT
            Repeat II
AATAAAAAACAGCTATCCATATAAACACATCAGTACGAAAATCCTAATTCATATTTAATAA
AAATAATTTAATTAAATTATAATTTCTAAACTATCCTAAATCCACGTTCATCAAAGGTAG
TTTTTTTTTTTTTTCGTAAATTTGTAATTTTCAATAACATAGAAAAATAAATTGTATATA
    Poly-T
TATTAATAATACATAAATTATTTATATTCTATAAAATTTACTTCACAGTAATAAAAGGGT
ACCTATAATTTTTTTAAATAAATTTTACAATTATATACATATAACTACGGGATAGTAAAG
GTTATTGATATTAAATTGTTATATATATATAAAATATTTAAATAATTTAAATAAAGCATT
            Microsatellite-like repeating sequences (TA)6
TATTTAAATGTATATATATATATATATAATAAAATAAATAATTACAAATTACC······
       Microsatellite-like repeating sequences (TA)9
```

图 3 萧氏松茎象线粒体基因组控制区结构图

Fig. 3 The structure of the control region of the *Hylobitelus xiaoi* mitochondrial genome

3 讨论

萧氏松茎象线粒体基因组长度介于已报道的鞘翅目昆虫线粒体基因组长度范围，其中，最短的为花萤属的 *Chauliognathus opacus* 14 893 bp (Sheffield *et al*., 2009)，最长的为窗萤 *Pyrocoelia rufa* 17 739 bp (Bae *et al*., 2004)。基因组中基因次序为典型的六足动物线粒体基因组基因排列次序。最大的基因间隔区长度为 232 bp，位于 *trnS*^{UCN}和 *nad*1 之间，而之前已经发现在许多昆虫的线粒体基因组 *trnS*^{UCN}和 *nad*1 之间都存在约 20 bp 的基因间隔区。而且，类似的基因间隔区在其他鞘翅目昆虫中也有报道，如在窗萤线粒体基因组 *nad*2 和 *trnW* 之间存在一长度为 1 724 bp 的基因间隔区 (Bae *et al*., 2004)；在 *Trachypachus holmbergi* 线粒体基因组 *trnW* 和 *trnC* 之间存在一长度为 45 bp 的基因间隔区，在 *Cyphon* sp. BT0012 线粒体基因组 *nad*2 和 *trnW* 之间存在一长度为 177 bp 的基因间隔区，在 *Chaetosoma scaritides* 线粒体基因组 *trnD* 和 *atp*8 之间存在一长度为 83 bp 的基因间隔区，在 *Priasilpha obscura* 线粒体基因组 *trnY* 和 *cox*1 之间存在一长度为 203 bp 的基因间隔区(Sheffield *et al*., 2008)。与窗萤线粒体基因组中的基因间隔区一样，萧氏松茎象线粒体基因组中 *trnS*^{UCN}和 *nad*1 之间的基因间隔区双链均未形成有效的开放阅读框。

萧氏松茎象线粒体基因组发现 1 个额外的 *trnV*-like 序列，类似的情况同样在膜翅目的红光熊蜂 *Bombus ignitus* 和直翅目的亚洲飞蝗 *Locusta migratoria migratoria* 线粒体基因组中均有报道。其中，在膜翅目红光熊蜂中，共发现 5 个 tRNA-like 结构，分别为 2 个 *trnL*^{UUR}-like、2 个 *trnS*^{AGN}-like 和 1

个 *trnF*-like（Cha *et al.*, 2007），在直翅目亚洲飞蝗中发现 3 个 tRNA-like 结构，分别为 1 个 *trnI*-like 和 2 个 $trnL^{CUN}$-like（Ye *et al.*, 2012）。尽管如此，黄原等（2010）认为最终只能是通过实验方法，特别是线粒体转录组分析技术，才能最终判定这类 tRNA-like 结构是否存在。

$trnS^{AGN}$ 的反密码子由 TCT 替代 GCT，类似的情况在鞘翅目的十二星负泥虫 *Crioceris duodecimpunctata*、天门冬叶甲 *Crioceris asparagi* 和 *Tribolium castanaeum* 及膜翅目的西方蜜蜂 *Apis mellifera* 线粒体基因组中已有报道（Crozier and Crozier, 1993; Friedrich and Muqim, 2003; Stewart and Beckenbach, 2003）。$trnS^{AGN}$ 的二级结构符合 Steinberg 等（1997）中异常 tRNA 二级结构类型-9 $trnS^{AGN}$，反密码子臂延长形成 9 bp（中间含 1 个碱基突起），TΨC 臂由正常的 5 bp 变为 6 bp，DHU 臂缩短仅 1 bp，各个臂之间没有连接碱基（Steinberg *et al.*, 1997）。

线粒体控制区是线粒体基因组中最主要的非编码区，其长度变异很大，从几十到数千碱基不等（Zhou *et al.*, 2007; Mancini *et al.*, 2008）。通常认为，其可能包含一系列与线粒体基因组的复制和转录相关的调控元件。此前报道，在一些昆虫线粒体控制区中发现 Poly-T 和 $[TA(A)]_n$（Stewart and Beckenbach, 2003; Saito *et al.*, 2005; Zhang *et al.*, 2011; 夏靖等, 2011），并推测其可能与线粒体基因组的复制和转录的调控相关（Mancini *et al.*, 2008; Zhang *et al.*, 2011）。Poly-T 被认为是全变态昆虫 mtDNA 的 N 链复制起始位点的识别位点（Saito *et al.*, 2005）。萧氏松茎象线粒体基因组控制区中共发现 10 处长度不少于 5 bp 的 poly-T（最长的 poly-T 长度为 14 bp）和 2 处 $(TA)_n$，分别为 $(TA)_6$ 和 $(TA)_9$。

本研究采用"通用引物扩增并测定保守基因片段——特异性 L-PCR 引物设计和扩增——基于 L-PCR 扩增结果的嵌套 PCR 扩增"策略测定了萧氏松茎象线粒体基因组全序列，主要发现如下：1）萧氏松茎象线粒体基因组与其他鞘翅目昆虫相比，在 $trnS^{UCN}$ 和 *nad*1 之间存在一个 232 bp 的基因间隔区；2）在 N 链上与 *trnD*（J 链）对应的位置存在一个 *trnV*-like 序列，反密码子为 GAC，长度为 69 bp，其中 65 bp 与 *trnD* 重叠；3）基因组控制区中存在 10 处长度不少于 5 bp 的 poly-T（最长的 poly-T 长度为 14 bp）和 2 处 $(TA)_n$，分别为 $(TA)_6$ 和 $(TA)_9$。由于本研究仅对单头萧氏松茎象线粒体基因组进行了测定，尚未证实这些现象是否在所有萧氏松茎象个体中广泛存在。

致谢　河北大学生命科学学院周志军博士参与了技术指导工作，在此表示感谢！

参考文献（References）

Bae JS, Kim I, Sohn HD, Jin BR, 2004. The mitochondrial genome of the firefly, *Pyrocoelia rufa*: complete DNA sequence, genome organization, and phylogenetic analysis with other insects. *Mol. Phylogenet. Evol.*, 32(3): 978-985.

Cha SY, Yoon HJ, Lee EM, Yoon MH, Hwang JS, Jin BR, Han YS, Kim I, 2007. The complete nucleotide sequence and gene organization of the mitochondrial genome of the bumblebee, *Bombus ignitus* (Hymenoptera: Apidae). *Gene*, 392(1-2): 206-220.

Crozier RH, Crozier YC, 1993. The mitochondrial genome of the honeybee *Apis mellifera*: complete sequence and genome organization. *Genetics*, 133(1): 97-117.

Folmer O, Black M, Hoeh W, Lutz R, Vrijenhoek R, 1994. DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates. *Mol. Mar. Biol. Biotechnol.*, 3(5): 294-299.

Friedrich M, Muqim N, 2003. Sequence and phylogenetic analysis of the complete mitochondrial genome of the flour beetle *Tribolium castanaeum*. *Mol. Phylogenet. Evol.*, 26(3): 502-512.

Huang Y, Liu N, Lu HM, 2010. Research progress in mitochondrial genomes of the Orthoptera insects. *Acta Entomol. Sin.*, 53(5): 581-586.［黄原，刘念，卢慧甍，2010. 直翅目昆虫线粒体基因组研究进展. 昆虫学报，53(5): 581-586］

Li GH, Wang W, Zhao TH, 2012. RAPD analysis on genetic diversity of *Hylobitelus xiaoi* Zhang from different geographical population in China. *Journal of Central South University of Forestry & Technology*, 32(5): 149-154.［李国宏，王伟，赵同海，2012. 不同地区萧氏松茎象遗传多样性的 RAPD 分析. 中南林业科技大学学报，32(5): 149-154］

Liu N, Hu J, Huang Y, 2006. Amplification of grasshoppers complete mitochondrial genomes using long PCR. *Chinese Journal of Zoology*, 41(2): 61-65.［刘念，胡婧，黄原，2006. 应用长 PCR 扩增蝗虫线粒体全基因组. 动物学杂志，41(2): 61-65］

Lowe TM, Eddy SR, 1997. tRNAscan-SE: a program for improved detection of transfer RNA genes in genomic sequence. *Nucleic Acids Res.*, 25(5): 955-964.

Luo YS, Mei RL, 2002. *Hylobitelus xiaoi* shows rapid spreading tendency. *Jiangxi Plant Protection*, 25(1): 21-22.［罗永松，梅仁莲，2002. 萧氏松茎象呈迅速蔓延趋势. 江西植保，25(1): 21-22］

Mancini E, De Biase A, Mariottini P, Bellini A, Audisio P, 2008. Structure and evolution of the mitochondrial control region of the pollen beetle *Meligethes thalassophilus* (Coleoptera: Nitidulidae). *Genome*, 51(3): 196-207.

Saito S, Tamura K, Aotsuka T, 2005. Replication origin of mitochondrial DNA in insects. *Genetics*, 171(4): 1695 – 1705.

Schattner P, Brooks AN, Lowe TM, 2005. The tRNAscan-SE, snoscan and snoGPS web servers for the detection of tRNAs and snoRNAs. *Nucleic Acids Res.*, 33: 686 – 689.

Sheffield NC, Song H, Cameron SL, Whiting MF, 2008. A comparative analysis of mitochondrial genomes in Coleoptera (Arthropoda: Insecta) and genome descriptions of six new beetles. *Mol. Biol. Evol.*, 25(11): 2499 – 2509.

Sheffield NC, Song H, Cameron SL, Whiting MF, 2009. Nonstationary evolution and compositional heterogeneity in beetle mitochondrial phylogenomics. *Syst. Biol.*, 58(4): 381 – 394.

Simon C, Buckley TR, Frati F, Stewart JB, Beckenbach AT, 2006. Incorporating molecular evolution into phylogenetic analysis, and a new compilation of conserved polymerase chain reaction primers for animal mitochondrial DNA. *Annu. Rev. Ecol. Evol. Syst.*, 37: 545 – 579.

Song YS, Wang MX, Song JX, Yi YW, 2001. Pest risk analysis of *Hylobitelus xiaoi* Zhang. *Forest Pest and Disease*, 3(3): 3 – 5. [宋玉双, 王明旭, 宋金秀, 益延葳, 2001. 森林有害生物萧氏松茎象的危险性分析. 中国森林病虫, 3(3): 3 – 5]

Staden R, Beal KF, Bonfield JK, 2000. The Staden package, 1998. *Methods Mol. Biol.*, 132: 115 – 130.

Steinberg S, Leclerc F, Cedergren R, 1997. Structural rules and conformational compensations in the tRNA L-form. *J. Mol. Biol.*, 266(2): 269 – 282.

Stewart JB, Beckenbach AT, 2003. Phylogenetic and genomic analysis of the complete mitochondrial DNA sequence of the spotted asparagus beetle *Crioceris duodecimpunctata*. *Mol. Phylogenet. Evol.*, 26(3): 513 – 526.

Su ZH, Ohama T, Okada TS, Nakamura K, Ishikawa R, Osawa S, 1996. Phylogenetic relationships and evolution of the Japanese Carabinae ground beetles based on mitochondrial ND5 gene sequences. *J. Mol. Evol.*, 42:124 – 129.

Tamura K, Dudley J, Nei M, Kumar S, 2007. MEGA4: molecular evolutionary genetics analysis (MEGA) software version 4.0. *Mol. Biol. Evol.*, 24: 1596 – 1599.

Tang YL, Yu L, Wen XS, Shi MQ, Yang QP, Deng SS, 2006. Research progress on *Hylobitelus xiaoi* Zhang. *Jiangxi Plant Protection*, 29(4): 163 – 169. [唐艳龙, 余林, 温小遂, 施明清, 杨清培, 邓水生, 2006. 萧氏松茎象研究进展. 江西植保, 29(4): 163 – 169]

Wen XS, Kuang YY, Shi MQ, Luo YS, Deng RL, Sun JH, 2004. Life history, oviposition and feeding behavior of *Hylobitelus xiaoi* Zhang (Coleoptera: Curculionidae). *Acta Entomol. Sin.*, 47(5): 624 – 629. [温小遂, 匡元玉, 施明清, 罗永松, 邓荣林, 孙江华, 2004. 萧氏松茎象的生活史、产卵和取食习性. 昆虫学报, 47(5): 624 – 629]

Xia J, Hu J, Zhu GP, Zhu CD, Hao JS, 2011. Sequencing and analysis of the complete mitochondrial genome of *Calinaga davidis* Oberthür (Lepidoptera: Nymphalidae). *Acta Entomol. Sin.*, 54(5): 555 – 565. [夏靖, 胡静, 朱国萍, 朱朝东, 郝家胜, 2011. 大卫绢蛱蝶线粒体基因组全序列测定和分析. 昆虫学报, 54(5): 555 – 565]

Ye HY, Xiao LL, Zhou ZJ, Huang Y, 2012. Complete mitochondrial genome of *Locusta migratoria migratoria* (Orthoptera: Oedipodidae): three tRNA-like sequences on the N-strand. *Zool. Sci.*, 29(2): 90 – 96.

Zhang RZ, 1997. Description of a new species *Hylobitelus xiaoi* (Coleoptera: Curculionidae). *Scientia Silvae Sinicae*, 33(6): 541 – 545. [张润志, 1997. 萧氏松茎象——新种论述(鞘翅目: 象甲科). 林业科学, 33(6): 541 – 545]

Zhang YX, Zhou ZJ, Chang YL, Yang MR, Shi FM, 2011. The mtDNA control region structure and preliminary phylogenetic relationships of the genus *Gampsocleis* (Orthoptera: Tettigoniidae). *Zootaxa*, 2780: 39 – 47.

Zhou ZJ, Huang Y, Shi FM, 2007. The mitochondrial genome of *Ruspolia dubia* (Orthoptera: Conocephalidae) contains a short A + T-rich region of 70 bp in length. *Genome*, 50(9): 855 – 866.

(责任编辑: 赵利辉)